利用体外产气法研究 3 个品种柱花草与王草间的组合效应

张亚格[1,2]　李　茂[2]　周汉林[2*]　胡　琳[1,2]　李　韦[1,2]　徐铁山[2]

（1.海南大学农学院，海口 570100；2.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所，儋州 571737）

摘　要：本试验旨在利用体外产气法研究 3 个品种柱花草与王草间的组合效应。将 3 个品种柱花草[热研 2 号、20 号、21 号柱花草]与热研 4 号王草分别以 6 个比例[0:100、10:90、20:80、40:60、50:50、100:0]组合，利用体外产气技术，分析不同比例的组合对产气量、产气参数、体外干物质消化率(IVDMD)、氨态氮(NH_3-N)和微生物蛋白(MCP)含量的影响，计算各组合的单项组合效应值和综合组合效应值，进而筛选出各品种柱花草与王草的适宜比例。结果表明：1）热研 2 号和 20 号柱花草与王草不同比例组合的快速发酵部分产气量差异达到显著水平(P＜0.05)，快速发酵部分产气量达到最大的组合比例分别为 30:70 和 50:50。热研 2 号柱花草:王草、热研 21 号柱花草:王草分别为 50:50、40:60 时的 IVDMD 最高，与仅有王草差异显著(P＜0.05)。热研 2 号柱花草:王草、热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时 MCP 含量最高。NH_3-N 含量随着柱花草比例的递增出现先增高后降低的趋势，各品种柱花草与王草组合均以 30:70 时最高。2）3 个品种柱花草与王草的综合组合效应值均随着柱花草比例的增大而呈现单峰型增长趋势，其中热研 2 号柱花草:王草和热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时最高，热研 21 号柱花草:王草为 20:80 时最高。综合得出，在王草中添加适宜比例的柱花草能够提高体外发酵的产气量、IVDMD 和 MCP 含量，提高瘤胃微生物活力，产生正组合效应；热研 2 号、20 号柱花草与王草均以 30:70 组合效果最佳，热研 21 号柱花草与王草 20:80 组合效果最佳。

关键词：柱花草；王草；体外产气；组合效应

中图分类号：S816.5

收稿日期：2016-05-27

基金项目：中国热带农业科学院基本科研业务费（1630032015044）；国家重点基础研究发展计划课题（2014CB138706）

作者简介：张亚格(1992—)，女，山西永济人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: zhangyage1992@163.com

*通信作者：周汉林，研究员，硕士生导师，E-mail: zhouhanlin8@163.com

粗饲料是家畜生产的基本生产资料，粗饲料的品质对动物生长发育起着决定性的作用，利用牧草间的组合效应进行科学搭配，不仅可以提高牧草饲料的利用率、降低饲养成本，还能通过组合间的增益效应来提高家畜生产性能。柱花草是我国热带、亚热带地区重要的放牧和刈割兼用型豆科牧草[1]，具有营养价值丰富、适口性好等特点，自 1962 年首次由国外引进后，在我国南方地区得到广泛种植，目前已审定品种 12 个[2]，其中热研 2 号柱花草（*S. guianensis* Sw. Reyan No. 2）是 1991 年由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带牧草研究中心选育出来的优良品种，也是现今我国南方地区种植面积最广、应用最为广泛的品种，而热研 20 号柱花草（*S. guianensis* Sw. Reyan No. 20）和热研 21 号柱花草（*S. guianensis* Sw. Reyan No. 21）是 2011 年选育的抗炭疽病新品种[3-4]。热研 4 号王草（*Pennisetum purpureum*×*P.americanum* cv. Reyan No. 4）是一种优质的热带刈割型禾本科牧草，具有产量高、抗逆性强、适口性好等特点，在我国南方各省已有大面积种植[5-6]。豆科牧草与禾本科牧草组合饲喂家畜一直以来都是畜牧生产实践中常用到的组合方式，也是当前畜牧方面研究的热点问题。由于柱花草属于优质豆科牧草且产量低于禾本科牧草，市场价格也往往较高，并且考虑到过量的饲喂豆科牧草容易引起反刍动物瘤胃臌胀病，本试验中柱花草的添加量最高为 50%。于腾飞等[7]利用体外瘤胃发酵法研究花生蔓与 4 种粗饲料间组合效应，结果表明花生蔓与青贮玉米秸、干玉米秸和羊草均以 20:80 组合效果最好。柱花草和王草作为我国南方地区常见的优质牧草，也常被农户混合饲喂，但其混合比例并未得到科学的指导。本试验将热研 2 号、20 号和 21 号柱花草与热研 4 号王草分别以 0:100、10:90、20:80、40:60、50:50、100:0 组合，利用体外产气技术，分析不同比例的组合对产气量、产气参数、体外干物质消化率(IVDMD)、氨态氮(NH_3-N)和微生物蛋白(MCP)含量的影响，计算各组合的单项组合效应值和综合组合效应值，进而筛选出各品种柱花草与王草的最佳比例。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试植物为热研 2 号、20 号、21 号柱花草与热研 4 号王草（均为营养期），于 2015 年 8 月 24 日采集于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所农业部热带牧草种质圃。采集的植物样本通过 110 ℃杀青 30 min 后用 65 ℃烘 48 h，粉碎过 40 目筛制成样品备测。瘤胃液取自 3 头年龄和体重相近的成年海南黑山羊。

1.2　试验设计

热研 2 号、20 号、21 号柱花草干草粉分别与热研 4 号王草干草粉以 0:100、10:90、20:80、40:60、50:50、100:0 组合进行体外产气试验，每种组合 3 个重复。

1.3　体外产气试验

体外产气技术采用 Zhao 等[8]的培养液的配制方法和试验方法。

缓冲液Ⅰ：23.5 g $Na_2HPO_4•12H_2O$、12.5 g $NaHCO_3$ 和 11.5 g NH_4HCO_3 溶于 400 mL 蒸馏水中；缓冲液Ⅱ：23.5 g NaCl、28.5 g KCl、6.0 g $MgCl_2•6H_2O$、2.63 g $CaCl_2•2H_2O$ 溶于 1 000 mL 蒸馏水中；混合培养液：取 400 mL 缓冲液Ⅰ和 50 mL 缓冲液Ⅱ混合，然后加入蒸馏水，使这种混合的缓冲液终体积达到 500 mL。缓冲液Ⅰ和混合培养液现用现配。

选择 3 头年龄和体重相近的成年海南黑山羊，安装永久性瘤胃瘘管，在晨饲(09:00)前抽取瘤胃液，经 4 层纱布过滤，量取 312.5 mL 过滤后的瘤胃液于预先加入了 1 000 mL 蒸馏水并在 38 ℃水浴中预热的真空容器中，然后加入 250 mL 预先配制好并在 38 ℃水浴中预热的混合培养液，并持续通入 CO_2 约 10 min。称取按不同比例混合好的草粉干样 0.2 g，倒入提前称好质量的尼龙袋(3 cm×5 cm)中，绑紧后放入注射器前端。取 30 mL 瘤胃液-缓冲液的混合液加到每一个注射器中，排净空气，使其保持真空状态，并封闭注射器口，记录活塞的位置，并在 38 ℃的水浴摇床中培养。本试验设计在发酵开始后 2、4、6、8、10、12、24、30、36、48、72 h 读取这 11 个时间点的产气量，产气量为相应时间点的活塞的位置读数减去其初始位置读数和空白产气量（空白注射器中加入 30 mL 瘤胃液-缓冲液和 1 个空的尼龙袋，与试验注射器同时培养读数）。

1.4　测定指标与方法

测定不同比例混合好的草粉干物质(DM)、粗蛋白质(CP)、粗脂肪(EE)、中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、有机物(OM)含量，参照张丽英[9]的方法。体外产气试验末期（72 h）测定人工瘤胃液 NH_3-N 及 MCP 含量，NH_3-N 含量测定采用凯氏定氮法[10]，MCP 含量测定采用三氯醋酸(TCA)沉淀蛋白质法[11-12]。

1.5　相关计算公式

1.5.1　IVDMD

IVDMD（%）=(样本质量-残渣质量)/样本质量×100。

1.5.2　体外发酵参数

将各样品不同时间点的产气量代人由 Ørskov 等[13]提出的以下模型：

$$GP=a+b(1-e^{-ct})。$$

式中：*GP* 为 *t* 时间点的产气量（mL）；*a* 为饲料快速发酵部分产气量（mL）；*b* 为慢速发酵部分产气量（mL）；*c* 为 *b* 的速率常数（mL/h）；*a*+*b* 为潜在产气量（mL）。

根据非线性最小二乘法原理，求出 a、b、c。

1.5.3　组合效应值

单项组合效应(single-factors associative effects,SFAE)值的计算采用以下公式：

$$单项组合效应值=\frac{实测值-加权估算值}{加权估算值}。$$

综合组合效应(synthetically associative effects,AEs)值的计算采用以下公式：

$$综合组合效应值(\%)=\left[\left(\frac{GP实测值}{GP加权估算值}\times\frac{SUB_{GP}}{SUB_{GP}+SUB_{MCP}}+\frac{MCP实测值}{MCP加权估算值}\times\frac{SUB_{MCP}}{SUB_{GP}+SUB_{MCP}}\right)-1\right]\times 100$$ [7]。

式中：实测值为样品某一指标实测值；加权估算值=A 饲料某一指标实测值×A 饲料配比(%)＋B 饲料某一指标实测值×B 饲料配比(%)；SUB_{GP} 为用于生成气体所需的饲料底物样品质量(mg)，SUB_{GP}=2.27(mg/mL)×产气量(mL)，2.27 为每生成 1 mL 气体平均所需的饲料底物样品数量[14]；SUB_{MCP} 为用于生成 MCP 所需的饲料底物样品质量(mg)，SUB_{MCP}=MCP(mg)/0.625，其中 0.625 为 MCP 干物质中蛋白质的含量[15]。

1.6　数据统计与分析

采用 Excel 2003 对数据进行整理，并采用 SAS 9.3 软件包进行统计分析，用平均值和标准误表示测定结果，用 Duncan 氏法对各测定数据进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　不同比例柱花草与王草组合的体外产气特性

3 个品种柱花草与王草按不同比例组合对体外产气特性的影响见表 1。不同品种柱花草与王草的不同比例组合间产气量、慢速发酵部分产气量、潜在产气量和慢速发酵部分产气量的速率常数之间差异均不显著(P＞0.05)，其中产气量与潜在产气量的变化规律基本一致；热研 2 号和 20 号柱花草与王草不同比例组合的快速发酵部分产气量差异达到显著水平(P＜

0.05)，快速发酵部分产气量达到最大的组合比例分别为 30:70 和 50:50，热研 21 号柱花草:王草为 10:90 时快速发酵部分产气量达到最大，但各比例间差异未达显著水平(P>0.05)。

柱花草与王草组合的 IVDMD 均高于仅有王草，其中热研 2 号柱花草:王草、热研 21 号柱花草:王草分别为 50:50、40:60 时的 IVDMD 最高，与仅有王草差异显著(P<0.05)，热研 21 号柱花草与王草各比例组合间 IVDMD 差异不显著(P>0.05)。热研 2 号柱花草:王草、热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时 MCP 含量最高，热研 2 号柱花草:王草为 30:70 时显著高于 50:50 时(P<0.05)，热研 20 号柱花草:王草为 30:70 显著高于 0:100、10:90、20:80、40:60、100:0 时(P<0.05)；热研 21 号柱花草:王草为 50:50 时 MCP 含量最高，但与其他比例间差异不显著(P>0.05)。NH_3-N 含量随着柱花草比例的递增出现先增高后降低的趋势，各品种柱花草与王草组合均以 30:70 时最高。

表 1　不同比例柱花草与王草组合的体外产气特性

Table 1　*In vitro* gas production situations of combinations of stylosanthes with king grass at different proportions

项目 Items	比例 Proportion	产气量 Gas production/mL			产气参数 Gas production parameters				体外干物质消化率 IVDMD/%	微生物蛋白 MCP/(mg/mL)	氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)
		24 h	48 h	72 h	a/mL	b/mL	a+b/mL	c/(mL/h)			
热研 2 号柱花草:王草 *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2:king grass	0:100	25.17±8.00	34.50±6.33	40.17±5.78	-3.73±1.81^{ab}	47.87±6.58	44.14±7.04	0.05±0.03	65.27±7.73^{b}	1.42±0.07^{ab}	49.71±7.99^{b}
	10:90	20.33±4.71	27.67±6.65	35.67±5.44	-3.59±2.59^{ab}	45.33±7.15	41.74±6.89	0.03±0.01	69.70±6.71^{ab}	1.71±0.71^{ab}	61.88±3.13^{ab}
	20:80	15.00±3.00	21.00±8.00	26.50±7.42	0.27±1.91^{ab}	34.90±10.94	35.17±12.85	0.09±0.05	71.88±0.92^{ab}	2.14±0.21^{ab}	58.35±3.73^{ab}
	30:70	24.17±2.39	31.83±0.62	37.17±3.01	2.17±1.68^{a}	39.25±2.89	41.41±4.77	0.03±0.01	69.54±3.05^{ab}	2.69±0.22^{a}	69.16±11.57^{a}
	40:60	28.00±7.86	34.67±6.33	40.33±7.59	-2.57±0.59^{ab}	47.42±7.67	44.85±7.99	0.04±0.02	70.24±2.53^{ab}	2.20±0.52^{ab}	59.84±6.93^{ab}
	50:50	19.00±1.41	28.00±0.82	32.00±1.73	-5.97±0.86^{b}	40.15±1.75	34.13±0.70	0.04±0.00	74.94±3.16^{a}	1.04±0.40^{b}	65.97±3.86^{ab}
	100:0	16.67±3.77	23.33±4.32	25.67±3.09	-0.15±4.77^{ab}	27.99±6.56	27.84±1.79	0.04±0.02	72.61±3.24^{ab}	1.80±0.45^{ab}	49.46±6.77^{b}
热研 20 号柱花草:王草 *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20:king grass	0:100	25.17±8.00	34.50±6.33	40.17±5.78	-3.73±1.81^{b}	47.87±6.58	44.14±7.04	0.05±0.03	65.27±7.73	1.42±0.07^{cd}	49.71±7.99^{bc}
	10:90	23.00±0.00	31.50±0.50	38.00±2.83	-6.48±1.14^{b}	47.24±1.69	40.76±2.83	0.04±0.00	71.67±1.04	1.06±0.43^{d}	66.71±1.54^{a}
	20:80	20.50±2.50	28.50±3.50	35.00±2.00	-2.50±1.91^{ab}	41.17±2.17	38.66±2.58	0.03±0.01	66.73±2.72	2.04±0.26^{bc}	61.18±4.30^{ab}
	30:70	29.67±8.50	36.67±8.50	42.33±8.65	-0.79±1.99^{ab}	44.80±8.69	44.01±7.21	0.04±0.01	71.89±4.39	3.16±0.41^{a}	71.44±6.22^{a}
	40:60	27.33±3.30	34.00±2.45	39.33±2.50	-2.64±0.15^{ab}	42.85±3.25	40.21±3.35	0.05±0.01	71.16±0.92	2.13±0.34^{bc}	62.36±7.16^{ab}
	50:50	28.50±1.50	38.50±4.50	44.00±5.66	2.59±3.07^{a}	44.70±7.95	47.29±4.88	0.03±0.00	68.04±4.41	2.45±0.55^{ab}	68.50±1.77^{a}
	100:0	22.00±2.08	28.00±2.08	30.67±1.25	-2.50±2.10^{ab}	34.71±1.76	32.21± 2.12	0.05±0.00	73.82±5.21	1.30±0.55^{cd}	42.64±2.37^{c}
热研 21 号柱花草:王草 *S. guianensis* Sw. Reyan No. 21:king grass	0:100	25.17±8.00	34.50±6.33	40.17±5.78	-3.73±1.81	47.87±6.58	44.14±7.04	0.05±0.03	65.27±7.73^{b}	1.42±0.07	49.71±7.99^{bc}
	10:90	23.00±4.08	33.00±3.27	36.33±4.11	-0.65±1.84	42.06±5.09	41.41±3.26	0.03±0.01	71.98±5.24^{ab}	1.70±0.45	54.55±2.63^{abc}
	20:80	25.33±4.03	35.00±2.45	40.67±3.09	-3.51±1.00	47.60±2.23	44.10±1.65	0.04±0.01	74.23±3.26^{ab}	1.75±0.62	53.39±8.93^{abc}
	30:70	19.50±1.50	29.50±2.50	34.50±2.50	-2.36±1.87	39.07±5.22	36.71±3.36	0.04±0.00	69.14±4.19^{ab}	1.56±0.80	67.27±4.08^{a}
	40:60	26.00±4.08	33.00±1.63	35.33±0.47	-6.26±1.86	44.26±2.27	38.00±0.46	0.05±0.01	75.23±4.35^{a}	2.03±0.46	63.68±0.40^{ab}
	50:50	25.33±4.50	33.33±5.91	38.00±4.97	-1.86±2.37	41.36±7.36	39.51±5.70	0.04±0.00	72.36±4.47^{ab}	2.30±0.74	58.71±11.08^{abc}

100:0	16.11±7.43	20.78±4.34	23.11±4.70	-2.41±2.96	26.14±17.07	23.74±14.13	0.05±0.01	70.58±2.12^{ab}	0.87±0.22	44.03±0.22^{c}

a:快速发酵部分产气量；b:慢速发酵部分产气量；a+b:潜在产气量；c：慢速发酵部分产气量的速率常数。同一项目、同列数据肩标相同或无字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同字母表示差异显著(P＜0.05)。下表同。

a: gas production of rapidly fermented fraction; b: gas production of slowly fermented fraction; a+b: potential gas production; c: rate constant of gas production of slowly fermented fraction. In the same column, values of the same item with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P＞0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P＜0.05). The same as below.

2.2 不同比例柱花草与王草的组合效应值

不同比例柱花草与王草的组合效应值见表 2。从单项组合相应指数来看，柱花草与王草不同比例的组合大部分为正组合效应，其中热研 2 号柱花草:王草和热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时 MCP 的组合效应值最高，热研 2 号柱花草:王草为 30:70 时显著高于 50:50 时(P＜0.05)，热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时显著高于 10:90、20:80、40:60 时(P＜0.05)。从综合组合相应指数来看，3 个品种柱花草与王草的综合组合效应值呈现了较为统一的规律性，都是随着柱花草比例的增大而呈现单峰型增长趋势，其中热研 2 号柱花草:王草和热研 20 号柱花草:王草为 30:70 时综合组合效应值最高，分别为 1.44 和 1.55，热研 21 号柱花草:王草为 20:80 时综合组合效应值达到最高，为 1.37。

表 2 不同比例柱花草与王草的组合效应值

Table 2 Associative effects index of combinations of stylosanthes with king grass at different proportions

项目 Items	比例 Proportion	单项组合效应值 SFAE value				综合组合效应值 AEs value/%
		72 h 产气量 Gas production at 72 h	体外干物质消化率 IVDMD	微生物蛋白 MCP	氨态氮 NH_3-N	
热研 2 号柱花草:王草 *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2:king grass	10:90	0.01±0.19	0.06±0.07	0.19±0.18^{ab}	0.28±0.22	1.08±0.13
	20:80	-0.11±0.30	0.08±0.10	0.44±0.12^{ab}	0.20±0.19	1.23±0.02
	30:70	0.14±0.10	0.03±0.06	0.76±0.11^{a}	0.42±0.15	1.44±0.11
	40:60	0.25±0.15	0.03±0.04	0.49±0.16^{ab}	0.22±0.19	1.32±0.50
	50:50	-0.01±0.17	0.09±0.05	-0.41±0.21^{b}	0.34±0.16	0.77±0.10
热研 20 号柱花草:王草 *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20:king grass	10:90	0.24±0.01	0.14±0.06	-0.27±0.18^{c}	0.51±0.01	1.15±0.05
	20:80	-0.06±0.23	0.00±0.04	0.46±0.03^{b}	0.30±0.10	1.19±0.12
	30:70	0.24±0.19	0.06±0.08	1.24±0.09^{a}	0.53±0.27	1.55±0.33
	40:60	0.12±0.14	0.04±0.03	0.58±0.31^{b}	0.33±0.11	1.35±0.24
	50:50	0.21±0.13	-0.02±0.02	0.75±0.07^{ab}	0.46±0.15	1.39±0.17

	10:90	0.07±0.08	0.10±0.06	0.25±0.27	0.13±0.07	1.26±0.07
热研 21 号柱花草:王草	20:80	0.23±0.16	0.13±0.09	0.34±0.16	0.12±0.19	1.37±0.10
S. guianensis Sw. Reyan No.	30:70	0.28±0.01	0.04±0.05	0.25±0.19	0.42±0.18	1.34±0.23
21:king grass	40:60	0.18±0.10	0.12±0.04	0.68±0.21	0.36±0.14	1.23±0.26
	50:50	0.39±0.03	0.07±0.07	1.06±0.77	0.28±0.13	1.04±0.11

3 讨 论

3.1 不同比例柱花草与王草组合的体外产气特性

体外发酵产气量的多少取决于牧草中可发酵有机物的含量和反刍动物瘤胃微生物对有机物的分解能力[16]，牧草中营养成分的组成和质量决定了可发酵有机物的含量，而瘤胃微生物活力取决于瘤胃能氮平衡的程度。本试验中 3 个品种柱花草与王草各组合产气量最大的比例分别为 40:60、50:50 和 20:80，与潜在产气量的变化趋势基本对应，其中热研 20 号柱花草:王草为 50:50 时产气量和潜在产气量均高于另外 2 个品种；热研 2 号柱花草:王草、热研 20 号柱花草:王草、热研 21 号柱花草:王草快速发酵部分产气量最大的比例分别为 30:70、50:50 和 10:90，慢速发酵部分产气量则均为 100:0 时最高，王草作为禾本科牧草，其碳水化合物含量通常高于豆科牧草，而产气量主要来源于植物中碳水化合物的发酵[17]，当加入柱花草后，潜在产气量的升高说明在王草基础饲粮中添加柱花草能提高山羊瘤胃微生物发酵性能。饲粮中可发酵碳水化合物和氮源的供应，即能氮平衡的程度，决定了饲料在瘤胃中的消化率[18]，本试验中添加柱花草的组合 IVDMD 均高于仅有王草，说明添加柱花草后补充了氮源，促进了山羊瘤胃中的能氮平衡，因而提高了山羊瘤胃的消化率。

山羊瘤胃微生物的数量和种类与消化率、生长发育息息相关，因为瘤胃作为反刍动物所特有的消化器官，其作用主要是对牧草中淀粉、纤维等有机物进行消化，尤其是对一些难降解的纤维物质，瘤胃微生物能够把粗纤维分解成碳水化合物和低级脂肪酸，将植物性蛋白质及 NH_3-N 转化成 MCP，将淀粉转化成糖等供山羊消化吸收。MCP 能提供反刍动物蛋白质需要的 40%～80%，是最主要的氮源供应者[19]。MCP 含量的多少反映了培养体系中微生物种群的数量、活力及其利用 NH_3-N 的能力[20]。本试验中，热研 2 号柱花草:王草、热研 20 号柱花草:王草、热研 21 号柱花草:王草 MCP 含量最高的比例分别为 30:70、30:70 和 50:50，说明在这些比例的组合下微生物的数量、活力达到最佳状态。

瘤胃液中 NH_3-N 是蛋白质降解和 MCP 合成的中间产物，因此瘤胃液中 NH_3-N 含量是衡量瘤胃微生物氮代谢的一个重要指标，而瘤胃液中 NH_3-N 含量过高或过低都不利于微生

物的生长繁殖[21]。研究表明，瘤胃液适宜 NH_3-N 含量为 3.3~8.0 mg/dL[22]，实际上 NH_3-N 含量在 1~76 mg/dL 变化[23]，本试验中 NH_3-N 含量为 42.64~71.44 mg/dL，属于正常变化范围，但高于适宜范围，原因可能在于培养时间的不同，试验测定样液均是 72 h 最终发酵后的瘤胃液，由于体外产气发酵装置的局限性，容器内容物不能外移，造成发酵终产物积累使得瘤胃微生物的生存环境发生改变导致大量微生物死亡，细菌溶菌、纤毛虫自溶等释放出氨。

3.2 不同比例柱花草与王草的组合效应值

柱花草作为豆科牧草，其在蛋白质含量上的优势大于禾本科牧草，而王草属于山羊常用禾本科粗饲料，具有高产和高能量等特性，本试验将两者进行一定比例的组合，不但表现了各自的优势还得到了相应的增益效果，促进了饲料间的能氮平衡，使之产生正组合效应。单项组合效应值显示，产气量只有热研 2 号柱花草:王草为 20:80、50:50 和热研 20 号柱花草:王草为 20:80 时产生负组合效应，IVDMD 只有热研 20 号柱花草:王草为 50:50 时为负组合效应，MCP 为热研 2 号柱花草:王草为 50:50 和热研 20 号柱花草:王草为 10:90 时产生负组合效应，综合组合效应值均为正组合效应。单项组合效应无法全面反映饲料利用情况，因而计算其综合组合效应值。苏海涯[24]研究表明，综合组合效应值计算方法综合考虑了产气量与 MCP 含量的影响，用来评定桑叶与 3 种饼粕间的组合效应在变化趋势上更有规律性也更为合理。根据综合组合效应结果，热研 2 号、20 号和 21 号柱花草与王草的最佳组合比例分别为 30:70、30:70、20:80。刘庭玉[25]通过体外法研究牧草的组合效应，发现豆科牧草与禾本科牧草之间的组合存在着明显的正组合效应，其中苜蓿:黑麦草为 60:40、苜蓿:沙打旺:狼尾草为 40:40:20 这 2 个配方显著改善了育肥羔羊生产性能和屠宰性能。孙国强等[26]利用体外瘤胃发酵法研究全株玉米青贮与花生蔓间的组合效应，发现当花生蔓添加量低于 50%时，其 24 h 产气量和 IVDMD 均为正组合效应，最终得出全株玉米青贮与花生蔓以 70:30 的比例组合最佳，与本试验结果相近。

4 结 论

①在王草中添加适宜比例的柱花草能够提高体外发酵的产气量、IVDMD 和 MCP 含量，提高瘤胃微生物活力，产生正组合效应。

②热研 2 号、20 号柱花草与王草均以 30:70 组合效果最佳，热研 21 号柱花草与王草 20:80 组合效果最佳。

参考文献:

[1] 丁西朋,张龙,罗小燕,等.柱花草 DUS 测试标准品种 DNA 指纹图谱构建[J].草业科学,2015,32(12):2047–2056.

[2] 白昌军,刘国道.柱花草良种繁育技术与管理[M].南京:江苏凤凰科学技术出版社,2014.

[3] 白昌军,刘国道,陈志权,等.热研 20 号太空柱花草选育研究报告[J].热带作物学报,2011,32(1):33–41.

[4] 尹晓畅.柱花草品种(系)评价及部分性状与分子标记的关联分析[D].硕士学位论文.海口:海南大学,2014.

[5] 马健,刘艳芳,杜云,等.禾王草与奶牛常用粗饲料瘤胃降解特性的对比研究[J].动物营养学报,2016,28(3):816–825.

[6] 李茂,字学娟,白昌军,等.不同生长高度王草瘤胃降解特性研究[J].畜牧兽医学报,2015,46(10):1806–1815.

[7] 于腾飞,张杰杰,孙国强.花生蔓与 4 种粗饲料间组合效应的研究[J].动物营养学报,2012,24(7):1246–1254.

[8] ZHAO G Y,LEBZIEN P.Development of an *in vitro* incubation technique for the estimation of the utilizable crude protein (uCP) in feeds for cattle[J].Archiv Für Tierernaehrung,2000,53(3):293–302.

[9] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3 版.北京:中国农业大学出版社,2003,66–71.

[10] 闫峻,王文杰,高玉鹏,等.自动凯氏定氮仪快速测定青贮饲料中的氨态氮[J].粮食与饲料工业,2009(4):47–48.

[11] COTTA M A,RUSELL J R.Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture[J].Journal of Dairy Science,1982,65(2):226–234.

[12] BRODERICK G,CRAIG W M.Metabolism of peptides and amino acids during *in vitro* protein degradation by mixed rumen organisms[J].Journal of Dairy Science,1989,72(10):2540–2548.

[13] ØRSKOV E R,MCDONALD L.The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J].The Journal of Agricultural Science,1979,92(2):499–503.

[14] BLÜMMEL M,MAKKAR H P S,BECKER K.*In vitro* gas production:a technique revisited[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2011,77(1/2/3/4/5):24–34.

[15] RUSSELL J B,O'CONNOR J D,FOX D G,et al.A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Ⅰ.ruminal fermentation[J].Journal of Animal Science,1992,70(11):3551–3561.

[16] 吕永艳,邢向明,孙国强.全株玉米青贮、苜蓿干草和全株小麦青贮间组合效应的研究[J].中国畜牧杂志,2015,51(15):71–75.

[17] 黄雅莉,邹彩霞,韦升菊,等.体外产气法研究半胱胺对水牛瘤胃发酵参数和甲烷产量的影响[J].动物营养学报,2014,26(1):125–133.

[18] CHEN L,GUO G,YUAN X J,et al.Effects of applying molasses,lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality,aerobic stability and *in vitro* gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2015,96(5):1678–1685.

[19] 李袁飞,郝建祥,马艳艳,等.体外瘤胃发酵法评定不同类型饲料的营养价值[J].动物营养学报,2013,25(10):2403–2413.

[20] 王志军,格根图,高静,等.苜蓿、沙打旺、高丹草、狼尾草和黑麦草间的组合效应研究[J].动物营养学报,2015,27(11):3628–3635.

[21] 李满双,薛树媛,王超,等.体外产气法研究沙柳混合发酵饲料对绵羊瘤胃内环境参数的影响[J].动物营养学报,2015,27(6):1943–1953.

[22] HOOVER W H.Chemical factors involved in ruminal fiber digestion[J].Journal of Dairy Science,1986,69(10):2755–2766.

[23] 袁翠林,于子洋,王文丹,等.豆秸、花生秧和青贮玉米秸间的组合效应研究[J].动物营养学报,2015,27(2):647–654.

[24] 苏海涯.反刍动物日粮中桑叶与饼粕类饲料间组合效应的研究[D].硕士学位论文.杭州:浙江大学,2002.

[25] 刘庭玉.饲草型全混日粮对肉羊生产性能影响研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.

[26] 孙国强,吕永艳,张杰杰.利用体外瘤胃发酵法研究全株玉米青贮与花生蔓和羊草间的组合效应[J].草业学报,2014,23(3):224–231.

A Study on Associative Effects of Three Cultivars of Stylosanthes with King Grass Using *in Vitro* Gas Production Technique

ZHANG Yage[1,2] LI Mao[2] ZHOU Hanlin[2*] HU Lin[1,2] LI Wei[1,2] XU Tieshan[2]

（1. *College of Agriculture*, *Hainan University*, *Haikou*, 570100, *China*; 2. *Tropical Crops Genetic Resources Institute*, *Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, *Danzhou* 571737, *China*）

Abstract: This experiment was carried out to investigate the associative effects of three cultivars of stylosanthes with king grass using *in vitro* gas production technique. Three cultivars of stylosanthes （*S. guianensis* Sw. Reyan No. 2, *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20 and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 21） were combined with *Pennisetum purpureum*×*P.americanum* cv.Reyan No. 4 (king grass) in different proportions (0:100, 10:90, 20:80, 40:60, 50:50 and 100:0), respectively. The effects of combinations at different proportions on gas production, gas production parameters, *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), and ammonia nitrogen (NH_3-N) and microbial protein (MCP) contents were analyzed using *in vitro* gas production technique. The single-factors associative effects value and synthetically associative effects value of each combination were calculated to select the best proportions. The results showed as follows: 1) significant differences were found in gas production of rapidly fermented fraction among different proportions of combinations of *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2 and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20 with king grass (P＜0.05), which reached the highest at proportions of 30:70 and 50:50, respectively. IVDMD reached the highest when *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2 : king grass and *S. guianensis*

*Corresponding author, professor, E-mail: zhouhanlin8@163.com （责任编辑 王智航）

Sw. Reyan No. 20 : king grass were 50:50 and 40:60, respectively, and were significantly different from that of king grass only ($P<0.05$). MCP content reached the highest when *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2 : king grass and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20 : king grass were 30:70. NH_3-N content tended to be firstly increased and then decreased with the increase of stylosanthes proportion, and all of the combinations reached the highest at 30:70. 2) Synthetically associative effects value of three cultivars of stylosanthes with king grass all showed unimodal increase with the increase of stylosanthes proportion, and reached the highest when *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2 : king grass and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20 : king grass were 30:70, and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 21 : king grass was 20:80. In conclusion, the supplementation of proper stylosanthes in king grass can improve gas production, IVDMD, MCP content and ruminal microbial activity, and acts positively associative effects; the effects are the best when *S. guianensis* Sw. Reyan No. 2 : king grass and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 20 : king grass and *S. guianensis* Sw. Reyan No. 21 : king grass are 30:70, 30:70 and 20:80, respectively.

Key words: stylosanthes; king grass; *in vitro* gas production; associative effects